

Rec'd PCT/EP 03 DEC 2004

Mod. C.E. - 1-4-7

MODULARIO
15-A-181



784 PCT

EP 03/05551

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

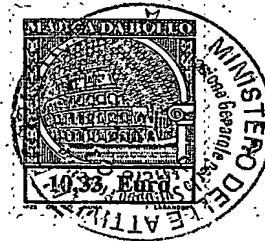
REC'D 22 SEP 2003

WIPO

PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N. **MI2002 A 001205**



*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

9 9610. 2003

oma, Il

IL DIRIGENTE

Riccardo Coppo

[Signature]

BEST AVAILABLE COPY

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

L'UFFICIALE ROGANTE

Best Available Copy

NUMERO DOMANDA

MI2002A 0015

REG A

DATA DI DEPOSITO

10/06/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

11/11/1111

D. TITOLO

"Uso di proteine per il trattamento della leishmaniosi"

L. RIASSUNTO

La presente invenzione ha per oggetto l'uso della proteina UK114 eventualmente associata ad ubiquitina per il trattamento della leishmaniosi negli esseri umani e negli animali.

M. DISEGNO



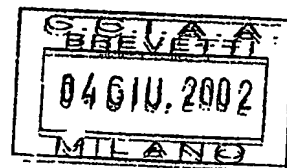
91 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

aB/mc "USO DI PROTEINE PER IL TRATTAMENTO DELLA
LEISHMANIOSI"

MI 2002 A 0 0 1 2 0 5

a nome : PHARMAPRODUCTS UK LIMITED

con sede in : Liverpool (Gran Bretagna)



* * *

La presente invenzione ha per oggetto l'uso della proteina UK114 eventualmente associata ad ubiquitina per il trattamento della leishmaniosi negli esseri umani e negli animali.

I protozoi del genere *Leishmania* sono parassiti intracellulari dei macrofagi e delle cellule dendritiche del cane, dell'uomo e di numerosi animali selvatici. Sulla base di criteri classificativi usati in medicina umana, la leishmaniosi si presenta in tre forme cliniche: viscerale (nell'uomo nota come "kala-azar"), cutanea e mucocutanea.

Per quanto riguarda il cane, anche se il quadro clinico caratteristico ha portato nel passato a separare una forma cutanea da una forma viscerale, oggi entrambe sono considerate forme evolutive della medesima malattia, indicata con il nome di leishmaniosi canina generalizzata (generalized canine leishmaniosis).

Il vettore è un insetto pungitore, del genere *Phlebotomus* nel Vecchio Mondo e del genere *Lutzomyia* nel Nuovo Mondo, all'interno del quale i protozoi si moltiplicano e si trasformano in organismi infettivi.

I parassiti del genere *Leishmania* appaiono, dentro il macrofago, come organismi rotondeggianti od ovoidali con il cinetoplasto a bastoncello situato adiacente al nucleo. L'organismo, che misura dai 2 ai 5 μm di diametro,

possiede un abbozzo di flagello che non si estende oltre il margine cellulare. Questa forma del parassita, **amastigote**, viene ingerita dal flebotomo durante il pasto di sangue. Nell'intestino dell'ospite intermedio il protozoo si trasforma in **promastigote**, caratterizzato dalla presenza di un lungo flagello libero che fuoriesce dall'estremità anteriore del parassita. L'organismo ha forma allungata e può raggiungere i 15 μm di lunghezza, flagello escluso; quest'ultimo ha in genere le stesse dimensioni del corpo.

Gli amastigoti ingeriti raggiungono l'intestino del flebotomo dove si trasformano in promastigoti. Questi ultimi si dividono ripetutamente per scissione binaria e successivamente migrano in senso anteriore. A livello della faringe, i parassiti si trasformano in promastigoti metaciclici, altamente mobili, che migrano verso la proboscide. I promastigoti vengono trasmessi al nuovo ospite vertebrato mediante la puntura dell'insetto.

Nell'ospite vertebrato i promastigoti vengono fagocitati dai monociti/macrofagi. Una volta fagocitato, il promastigote si trasforma in amastigote. Gli amastigoti si dividono per scissione binaria all'interno del vacuolo parassitoforo finché non raggiungono un numero tale da portare a rottura il macrofago. Gli amastigoti così liberati sono fagocitati da altri macrofagi.

La capacità degli amastigoti di sopravvivere nei macrofagi e di disseminarsi nell'organismo dipendono sia da fattori intrinseci al parassita sia da fattori legati al tipo di risposta immunitaria cellulo-mediata che viene elaborata dall'ospite. I macrofagi parassitati, se adeguatamente stimolati dai linfociti T helper (Th), sono in grado di produrre numerosi enzimi lisosomiali ed altri fattori compresi i metaboliti dell'ossigeno, il superossido e perossido

di idrogeno e l'ossido di azoto (NO), che sono tossici per il parassita.

Il tipo di risposta immunitaria cellulo-mediata ed il profilo di interleuchine (IL) prodotte determinano la resistenza X sensibilità all'infezione da *Leishmania*. Negli animali da laboratorio, la resistenza all'infezione da *Leishmania* è caratterizzata dalla risposta Th1, con la produzione di IL-12 ed interferone gamma (IFN γ) e attivazione dei macrofagi che eliminano il parassita. Al contrario negli animali sensibili all'infezione, la risposta è del tipo Th2, caratterizzata dalla produzione di IL-4 e IL-10 con conseguente soppressione dell'attività parassitocida dei macrofagi e la stimolazione dei linfociti B con l'aumento della produzione di immunoglobuline.

La risposta immunitaria umorale nella leishmaniosi è imponente, ma non è protettiva. Gli anticorpi specifici prodotti contro *Leishmania* sono privi di azione neutralizzante nei confronti del parassita.

Negli animali sensibili alla malattia, il protozoo è diffuso, all'interno dei macrofagi, in tutto l'organismo ed il parassita è stato osservato in tutti gli organi e tessuti del corpo tranne il sistema nervoso centrale. Il lento e continuo contatto dell'antigene parassitario con le cellule immunocompetenti è alla base dell'evoluzione patogenetica della malattia che è caratterizzata da:

iperglobulinemia, in genere policlonale, associata alla continua stimolazione dei linfociti B che è causa dell'incremento delle proteine totali e dell'inversione del rapporto albumine/globuline;

produzione di auto-anticorpi, probabilmente per reazione crociata fra antigeni parassitari e antigeni "self", causa di trombocitopenia ed anemia;

produzione e deposito di immunocomplessi, responsabili di quadri di



vascolite, glomerulonefrite e poliartrite.

La patogenesi delle lesioni cutanee, presenti nella maggior parte dei soggetti colpiti, non è ancora chiara. Secondo alcuni Autori, la persistenza del parassita all'interno del macrofago rappresenta uno stimolo continuo per l'infiltrazione di cellule infiammatorie, soprattutto plasmacellule, macrofagi e linfociti, in sede dermica. Secondo altri, il deposito di immunocomplessi sarebbe la causa principale della dermatite che spesso all'esame istologico presenta lesioni simili a quelle dovute ad altre patologie da immunocomplessi, come il lupus eritematoso sistemico. Infine, è possibile che le alterazioni cutanee siano il risultato dei fenomeni di vascolite.

La sintomatologia della leishmaniosi canina è estremamente variabile e può comprendere linfadenopatia periferica (oltre il 90% dei soggetti infetti), lesioni cutanee (>80%), congiuntivite cronica (50%), onicogrifosi (40%), anoressia (>35%), aumento dell'appetito (30%), dimagrimento (30%), febbre (20%), insufficienza renale (20%), epistassi (10%), uveite (8%), disturbi di deambulazione (6%).

I segni cutanei sono tra i più importanti della malattia. Vengono descritti diversi tipi di lesioni macroscopiche e microscopiche in corso di leishmaniosi canina: dermatite secca esfoliativa, dermatosi ulcerativa, dermatite nodulare, dermatite pustolosa sterile, paronichia e ipercheratosi nasale e/o digitale. Le lesioni cutanee sono generalmente di natura cronica, simmetrica e non pruriginosa.

Da recenti studi risulta evidente l'esistenza di un meccanismo compensativo, TNF-indipendente, capace di attivare i macrofagi nella risposta antileishmania. Considerato che la risposta Th1 mediata da interleuchina-12

(IL-12) ed interferone gamma ($IFN\gamma$) è paradossalmente responsabile, oltre che dell'attivazione dei macrofagi, anche della quasi totalità dei sintomi della leishmaniosi, potrebbe risultare vantaggioso esaltare tale meccanismo compensativo inibendo la risposta Th1.

Attualmente il trattamento di elezione, a base di gluconato di antimonio per infiltrazione (nella l. cutanea) o iniezione (nelle altre forme), può dare effetti tossici (nausea e vomito) tali da richiedere la sospensione del trattamento, che viene sostituito da quello con diammine aromatiche, quali la pentamidina, la cui tollerabilità è generalmente scarsa.

È stato ora trovato che la proteina di peso molecolare 14 kDa in SDS-PAGE ottenibile per estrazione da fegato di mammiferi con acido perclorico denominata UK114 descritta in EP 574394 e in US 5792744, eventualmente associata a ubiquitina (UK110), è utile per il trattamento della leishmaniosi.

La proteina UK114 ricombinante è nota da WO 00/63368.

La somministrazione sottocutanea, alle dosi e con i tempi indicati in tabella, di UK114 e di ubiquitina ad un gruppo di 10 cani con sintomi clinici eclatanti di leishmaniosi (linfadenopatia periferica, lesioni cutanee di grado elevato rappresentate soprattutto da piaghe ed ulcere sanguinanti con perdita di sostanza, anoressia, dimagrimento) ha portato, nell'arco di tempo della terapia stessa, alla guarigione completa di tutte le lesioni.

Nessun effetto collaterale negativo è stato osservato durante il trattamento.

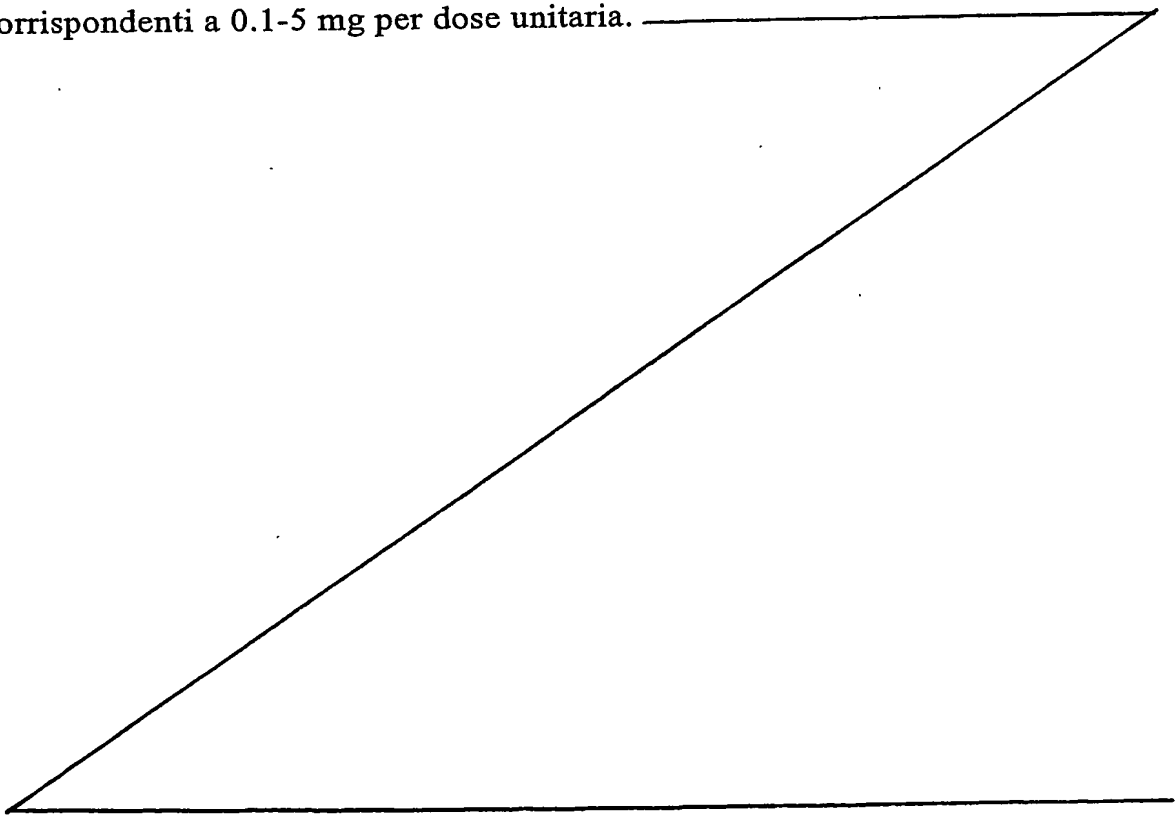
Questi dati dimostrano che la somministrazione di UK114 e di ubiquitina è in grado di curare in maniera totalmente sicura i sintomi clinici della leishmaniosi. Ciò è estremamente interessante considerata l'alta tossicità

dei farmaci attualmente usati in terapia e la possibilità di una risposta non sempre soddisfacente dal punto di vista clinico.

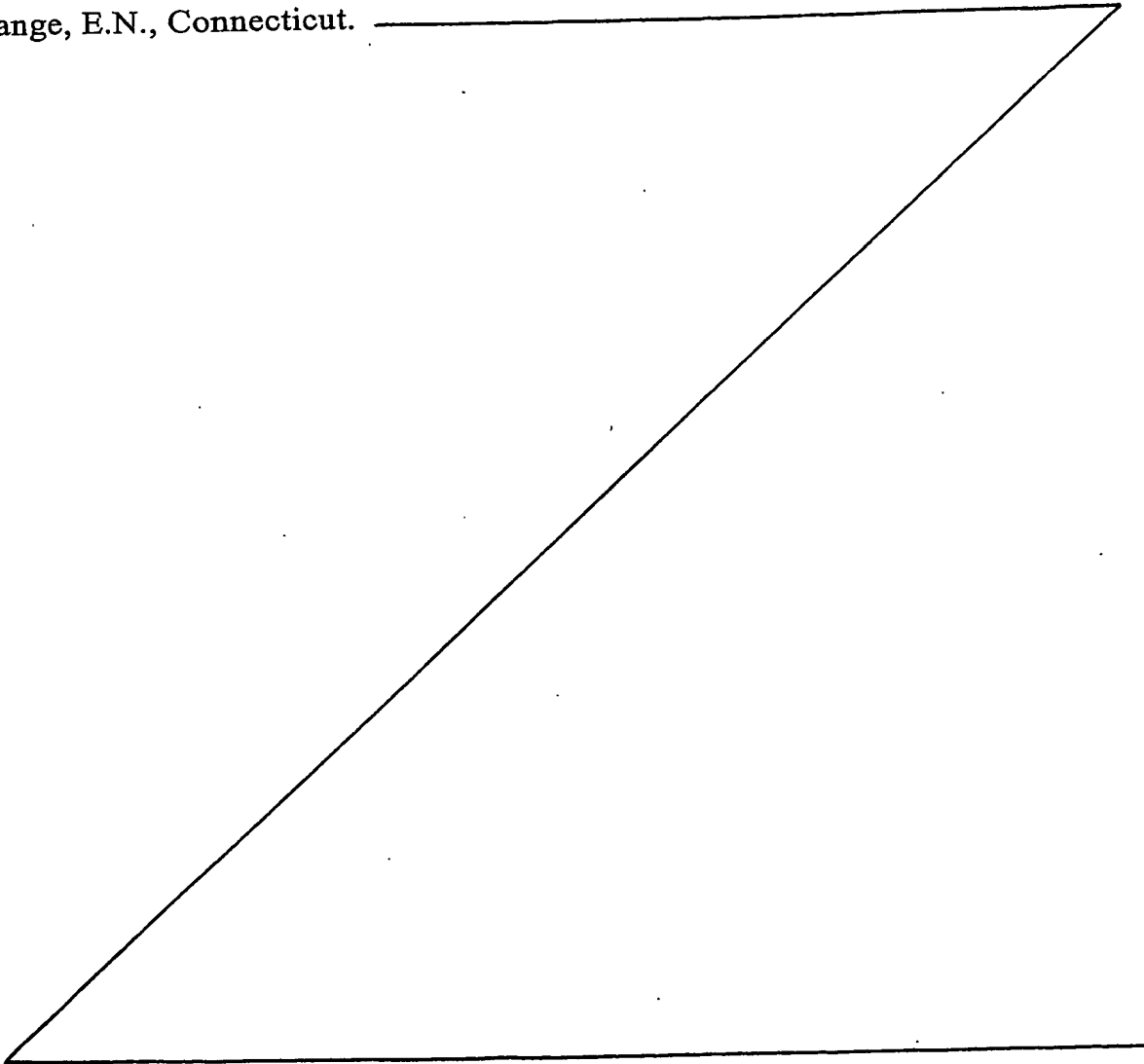
TABELLA

Peso paziente < 10 kg	1mg/die sottocute per 6 giorni 7° giorno: riposo 1 mg/die sottocute per altri 6 giorni
Peso paziente > 10 kg	Come sopra, ma raddoppiando il dosaggio: 2 mg/die

Per il trattamento terapeutico considerato, la proteina UK114 di origine estrattiva o ricombinante verrà pertanto opportunamente somministrata a soggetti affetti da leishmaniosi per via parenterale, in particolare sottocutanea o intramuscolare, a dosi variabili da 0.5 a 10 mg circa al giorno, fino alla scomparsa o alla sostanziale riduzione dei sintomi. Le composizioni secondo l'invenzione, in forma di soluzioni o sospensioni in solventi sterili preferibilmente acquosi, potranno inoltre contenere ubiquitina in quantità corrispondenti a 0.1-5 mg per dose unitaria.



BIBLIOGRAFIA

1. Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M, Jennings F.W.
Veterinary Parasitology 2nd ed., edizione italiana a cura di C. Genchi, UTET
1998.
 2. Murray H.W., Jungbluth A., Ritter E., Montelibano C., Marino
M.W. Visceral Leishmaniasis in Mice Devoid of Tumor Necrosis Factor and
Response to Treatment, Infection and Immunity, November 2000, p. 6289-
6293, Vol. 68, No. 11.
 3. Katzung B.G. Basic & Clinical Pharmacology, 1995 by Appleton &
Lange, E.N., Connecticut.
- 



RIVENDICAZIONI

1. Uso della proteina UK114 eventualmente in combinazione con ubiquitina per la preparazione di composizioni farmaceutiche o veterinarie per il trattamento della leishmaniosi negli essere umani e negli animali.
2. Composizioni farmaceutiche o veterinarie contenenti la proteina UK114 estrattiva o ricombinante, eventualmente associata a ubiquitina, in miscela con un veicolo opportuno, per il trattamento della leishmaniosi negli essere umani e negli animali.

Milano, 4 giugno 2002

Il Mandatario
(Bracco Mauro)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

